



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114317699 A

(43) 申请公布日 2022. 04. 12

(21) 申请号 202111593668.8

C12Q 1/70 (2006.01)

(22) 申请日 2021.12.23

C12Q 1/6883 (2018.01)

(71) 申请人 郑州华之源医学检验实验室有限公司

地址 450000 河南省郑州市河南自贸试验区郑州片区(郑东)明理路与白佛南路交叉口中原金融产业园一期一号楼

(72) 发明人 赵瑞瑞 童京京 刘淑莉 朱怡倩 曲径

(74) 专利代理机构 北京天盾知识产权代理有限公司 11421

代理人 王漾

(51) Int. Cl.

C12Q 1/686 (2018.01)

C12N 15/11 (2006.01)

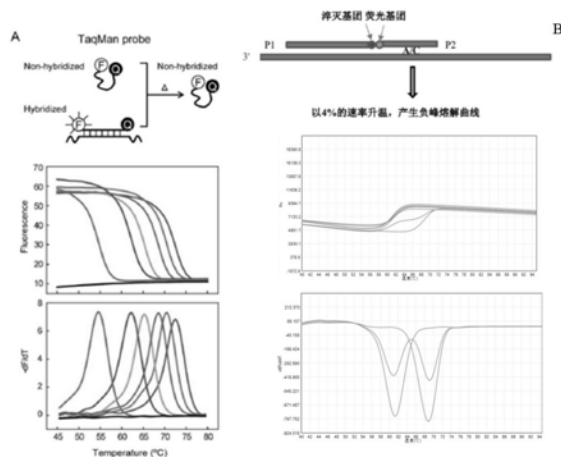
权利要求书1页 说明书11页  
序列表3页 附图6页

(54) 发明名称

一种基于熔解曲线正负峰形分析的多重PCR检测方法及应用

(57) 摘要

本发明公开了一种基于熔解曲线正负峰形分析的多重PCR检测方法及应用,属于基因检测技术领域,本发明将双标记自淬灭的TaqMan探针熔解曲线技术与两条邻近单标记探针联合淬灭的熔解曲线技术相结合,提出一种基于熔解曲线正负峰形分析的多重PCR检测方法及应用。本方法利用双标记自淬灭的TaqMan探针熔解曲线技术,获得正常的熔解峰,利用两条邻近单标记探针联合淬灭的熔解曲线技术获得倒置的熔解峰,实现单色荧光通道中,一个靶标的检测结果呈现正的熔解峰,另一个靶标的检测结果呈现负的熔解峰,使得单色荧光通道可同时检测至少两种靶标,本发明利用现有荧光PCR平台有限的荧光检测通道和在较窄的温度范围内单管实现多重靶标的检测,具有较大的市场和应用前景。



1. 一种基于熔解曲线正负峰形分析的多重PCR检测方法,其特征在于,包括如下步骤:

S1: 根据靶标基因位点序列,分别设计具有相同单色荧光通道的特异性上游引物、下游引物和探针序列,所述靶标基因位点的数量至少为2种;每两个靶标基因位点中,靶标基因位点A的探针为双标记自淬灭TaqMan探针,且5'端标记荧光基团,3'端标记淬灭基团,靶标基因位点B的探针为两条邻近单标记联合淬灭探针P1、P2,探针P1的3'端标记淬灭基团,探针P2的5'端标记荧光基团,3'端磷酸化封闭处理,探针P1的长度大于探针P2;

S2: 配制多重PCR反应体系,所述多重PCR反应体系包括每种所述靶标基因的特异性探针、每种所述靶标基因的特异性上游引物和下游引物;

S3: 进行PCR扩增,在PCR扩增周期结束后,进行熔解曲线分析,并根据熔解峰形状及熔解峰 $T_m$ 值的差异判断多重单核苷酸的基因型。

2. 根据权利要求1所述的一种基于熔解曲线正负峰形分析的多重PCR检测方法,其特征在于,步骤S1中,所述双标记自淬灭TaqMan探针序列长度介于18bp~30bp, $T_m$ 值介于45°C~75°C;所述单标记探针P1序列长度介于23bp~30bp, $T_m$ 值介于50°C~75°C;单标记探针P2序列长度介于15bp~25bp, $T_m$ 值介于45°C~70°C。

3. 根据权利要求1所述的一种基于熔解曲线正负峰形分析的多重PCR检测方法,其特征在于,所述荧光基团选自FAM、VIC、ROX、CY5,所述淬灭基团选自BHQ1、BHQ2、BHQ3。

4. 根据权利要求1~3任一所述的一种基于熔解曲线正负峰形分析的多重PCR检测方法,其特征在于,步骤S2中,靶标基因位点A的引物探针比例为上游引物:下游引物:探针=1:10:5;靶标基因位点B的引物探针比例为上游引物:下游引物:探针P1:探针P2=4:4:2:1。

5. 根据权利要求1~3任一所述的一种基于熔解曲线正负峰形分析的多重PCR检测方法,其特征在于,步骤S3中,靶标基因位点A基于引物不对称扩增的方式获得单链杂交产物,靶标基因位点B则采用引物对称扩增的方式获得双链扩增产物,通过快速降温的方式获得单链杂交产物,降温速率介于0.1°C/s~4°C/s,熔解曲线程序为:95°C保持1min,43°C~75°C升温并以0.04°C/s~0.06°C/s的升温速度采集荧光信号。

6. 如权利要求1~5所述的基于熔解曲线正负峰形分析的多重PCR检测方法在高血压精准用药相关基因多态性检测中的应用,其特征在于,所述高血压精准用药相关基因位点至少包括ACE(rs4646994)、ADRB1(rs1801253)、AGTR1(rs5186)、CYP2C9\*3(rs1057910)。

7. 根据权利要求6所述的基于熔解曲线正负峰形分析的多重PCR检测方法在高血压精准用药相关基因多态性检测中的应用,其特征在于,多重PCR检测所需引物的序列如SEQ ID NO.1~SEQ ID NO.8所示。

8. 根据权利要求6或7所述的基于熔解曲线正负峰形分析的多重PCR检测方法在高血压精准用药相关基因多态性检测中的应用,其特征在于,多重PCR检测所需探针的序列如SEQ ID NO.9~SEQ ID NO.14所示。

9. 根据权利要求8所述的基于熔解曲线正负峰形分析的多重PCR检测方法在高血压精准用药相关基因多态性检测中的应用,其特征在于,AGTR1(rs5186)及CYP2C9\*3(rs1057910)为同一荧光通道检测,共用ROX荧光基团标记;ACE(rs4646994)及ADRB1(rs1801253)为同一荧光通道检测,共用CY5荧光基团标记。

## 一种基于熔解曲线正负峰形分析的多重PCR检测方法及应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及多重基因检测技术领域,具体为一种基于熔解曲线正负峰形分析的多重PCR检测方法及应用。

### 背景技术

[0002] 多重PCR(Multiplex polymerase chain reaction,MPCR)是指通过一次PCR反应同时对多个靶标进行扩增,结合一定的检测手段对扩增产物进行检测从而实现对多个靶标进行诊断的技术。MPCR具有高效率、高通量、低成本的特性而被深入研究。多重PCR在微生物、遗传病、肿瘤、药物基因组学等学科中有着重要的应用。

[0003] 多重荧光定量PCR(Multiple fluorescence quantitative PCR)技术是在荧光定量PCR技术的基础上,利用几种不同荧光基团的组合,结合仪器对不同通道荧光的检测能力实现对多个靶标的实时定量检测。TaqMan水解探针(Hydrolysis probes)是多重荧光PCR体系中常用的一种探针,探针一端标记荧光基团,另一端标记淬灭基团,通过在不同序列末端标记不同荧光基团及相应的淬灭基团,即可形成不同的TaqMan水解探针,将上述探针及相应的扩增引物加至同一反应体系,即可实现对多个靶标的共同检测。分子信标(Molecular beacon)是多重PCR体系中另一种常用的探针,基于荧光共振能量转移(Fluorescence resonance energy transfer,FRET)的原理,当体系中不存在特异性的靶标时,分子信标会自发形成茎环结构,淬灭基团与荧光基团相互接近从而发生FRET,不会产生荧光。如果体系中存在特异性的靶标,在一定的条件下,茎环结构会打开并且与靶标进行复性,从而产生荧光信号。那么在同一个反应体系中加入几种靶标特异性的分子信标就能够实现对多个靶标的同时检测。基于水解探针和分子信标探针的多重荧光定量PCR技术的优点是简便快捷,然而受仪器荧光检测通道的限制,往往最多只能达到四重或五重检测。

[0004] 非特异性的荧光染料嵌入到DNA双链小沟中后,在特定的激发光激发后将会产生一定波长的荧光。以此为基础发展了熔解曲线(Melting curve)分析法,利用不同DNA序列具有不同 $T_m$ (Melting temperature)值的特征,在PCR反应结束后,通过程序升温使双链逐渐解链成单链,当达到双链特异的 $T_m$ 值所对应的温度时,荧光强度大幅度降低,利用这样的原理可以对PCR中不同长度的双链产物或相同长度不同GC含量的双链进行分析。在熔解曲线分析技术的基础上发展而来的高分辨率熔解曲线技术是一种利用饱和染料,借助高分辨率的仪器,实现对单个核苷酸熔解温度不同从而形成不同形态熔解曲线,进而对基因进行分析的新技术,它具有极高的灵敏度,能够检测出单个碱基之间的差别,目前主要应用于单核苷酸多态性分析、甲基化分析、基因突变、基因分型等领域。但基于荧光染料的多重PCR技术由于染料不具备特异性的识别能力,所以同一反应体系中通常只能使用一种荧光染料。

[0005] 为了弥补这两种方法的不足而开发出来的荧光探针熔解曲线技术(Fluorescence probe melting curve technique)具有成本低、多重检测能力更强的优点。通过在靶序列中选取相对保守的区域设计通用扩增引物,然后在引物对之间选取差异度较大的区域设计能够识别各种目标核酸序列的特异性探针,探针在扩增的过程中不会被完全水解,并且根

据检测通道的不同将探针进行分组,每个通道中包含多个特异性探针,通过调整探针的长度或GC含量对每条探针的 $T_m$ 值进行人为的调控,使得同一检测通道内针对不同靶标的检测探针 $T_m$ 值都间隔合适的差值,每个荧光通道均可定性检测多个靶标,最后通过熔解曲线进行分析。但该技术对引物探针设计要求较高,要求每一引物具有良好的特异性,无引物二聚体和非特异性扩增生成,且不同的探针 $T_m$ (熔解温度)值相差大于 $2^{\circ}\text{C}$ ,使得反应体系和反应条件的优化困难,且往往满足这些要求之后,难以保证 $T_m$ 接近的探针可以有效区分。

[0006] 基于微流控芯片(Microfluidic chip)的多重PCR技术通过在芯片微孔中预装填不同的引物对的方法将各重扩增限制在各自的独立空间内,再通过液流控制系统将模板引流到不同的微孔中,进而在微孔中进行特异的PCR扩增反应,最后再进行终点定性检测,从而实现对多个靶标的区分和鉴别,基于微流控芯片的多重PCR技术的优点是在一定程度上避免了非特异性扩增产物的生成以及在荧光定量PCR的基础上增加了检测重数。但是当模板浓度较低时,基于微流控的方法将模板分流至含特异性引物微孔中的概率降低,易产生假阴性结果,此外在检测方面,该技术需要配合扩增的特殊性而使用到高精密度的检测仪器,其技术的复杂性使其实现和临床推广应用较为困难。

[0007] 液相芯片技术(Liquid chip technology)被称为后基因组时代的芯片技术,也被称为x MAP技术。它可以同时对1份标本中的100种不同目的分子进行检测,并能在30min内检测96个不同的样本。其液相微球编码原理为,将两种荧光染料分别用10种不同的浓度两两混合形成 $10 \times 10$ 的荧光配比阵列,并对微球进行染色,得到100种不同荧光编码的微球。将荧光编码且共价结合了不同捕获探针的微球悬浮于一个液相体系中,先加入待检测分子与其反应,再加入带有荧光标记的报告分子,从而形成“微球-捕获探针-靶标-报告分子”复合物。检测时,该复合物在鞘液的作用下将逐个通过检测通道,接受两束不同波长的激发光照射并对相应的发射光进行检测,其中一束激光用于识别微球种类,即判定该种微球是对哪种特定的靶标进行检测,另一束激光用于检测微球上报告分子的荧光强度,从而实现对待测物质的定性和定量分析。但是由于需要将引物束缚至固相载体,这在一定程度上限制了引物与模板的碰撞概率并且导致其扩增效率降低,Luminex微珠法成本明显高于荧光PCR平台,且所需设备昂贵,普及程度较低。

[0008] 综上,现有的PCR检测手段存在多重检测能力差、检测通量低、检测成本高、检测的靶目标 $T_m$ 值差异不明显时难以区分的问题,难以应用于需要多重PCR检测的应用领域。

## 发明内容

[0009] 本发明的目的在于:提供一种基于熔解曲线正负峰形分析的多重PCR检测方法及其应用,解决多重荧光探针熔解曲线技术中引物及探针的设计难度高,多重靶标区分能力有限的难题,为临床提供一种检测成本低、通量高、多重检测能力更强的多重PCR检测方法,适用于在各个医疗、科研等领域的推广应用。

[0010] 本发明采用的技术方案如下:

[0011] 一种基于熔解曲线正负峰形分析的多重PCR检测方法,包括如下步骤:

[0012] S1:根据靶标基因位点序列,分别设计具有相同单色荧光通道的特异性上游引物、下游引物和探针序列,所述靶标基因位点的数量至少为2种;每两个靶标基因位点中,靶标基因位点A的探针为双标记自淬灭TaqMan探针,且5'端标记荧光基团,3'端标记淬灭基团,

靶标基因位点B的探针为两条邻近单标记联合淬灭探针P1、P2,探针P1的3'端标记淬灭基团,探针P2的5'端标记荧光基团,3'端磷酸化封闭处理,探针P1的长度大于探针P2。

[0013] S2: 配制多重PCR反应体系,所述多重PCR反应体系包括每种所述靶标基因的特异性探针、每种所述靶标基因的特异性上游引物和下游引物。

[0014] S3: 进行PCR扩增,在PCR扩增周期结束后,进行熔解曲线分析,并根据熔解峰形状及熔解峰 $T_m$ 值的差异判断多重单核苷酸的基因型。

[0015] 优选的,步骤S1中,所述双标记自淬灭TaqMan探针序列长度介于18bp~30bp, $T_m$ 值介于45°C~75°C;所述单标记探针P1序列长度介于23bp~30bp, $T_m$ 值介于50°C~75°C;单标记探针P2序列长度介于15bp~25bp, $T_m$ 值介于45°C~70°C。

[0016] 优选的,所述荧光基团选自FAM、VIC、ROX、CY5,所述淬灭基团选自BHQ1、BHQ2、BHQ3。

[0017] 优选的,步骤S2中,靶标基因位点A的引物探针比例为上游引物:下游引物:探针=1:10:5;靶标基因位点B的引物探针比例为上游引物:下游引物:探针P1:探针P2=4:4:2:1。

[0018] 优选的,步骤S3中,靶标基因位点A基于引物不对称扩增的方式获得单链杂交产物,靶标基因位点B则采用引物对称扩增的方式获得双链扩增产物,通过快速降温的方式获得单链杂交产物,降温速率介于0.1°C/s~4°C/s,熔解曲线程序为:95°C保持1min,43°C~75°C升温并以0.04°C/s~0.06°C/s的升温速度采集荧光信号。

[0019] 一种基于熔解曲线正负峰形分析的多重PCR检测方法在高血压精准用药相关基因多态性检测中的应用,所述高血压精准用药相关基因位点至少包括ACE(rs4646994)、ADRB1(rs1801253)、AGTR1(rs5186)、CYP2C9\*3(rs1057910)。

[0020] 优选的,多重PCR检测所需引物的序列如SEQ ID NO.1~SEQ ID NO.8所示。

[0021] 优选的,多重PCR检测所需探针的序列如SEQ ID NO.9~SEQ ID NO.14所示。

[0022] 优选的,AGTR1(rs5186)及CYP2C9\*3(rs1057910)为同一荧光通道检测,共用ROX荧光基团标记;ACE(rs4646994)及ADRB1(rs1801253)为同一荧光通道检测,共用CY5荧光基团标记。

[0023] 技术原理:双标记TaqMan探针游离于溶液中处于无规则卷曲状态时,荧光信号较弱,而探针与靶标序列杂交时形成伸展状态,荧光基团和淬灭基团相对远离,发射出较强的荧光信号,随着温度升高,杂交在产物上的探针与靶标序列逐渐解离,形成无规则卷曲状态,荧光信号逐渐减弱,对此进行熔解曲线分析,则可出现正常的熔解峰;两条邻近单标记探针的3'端淬灭基团与5'端荧光基团与靶标杂交相互接近时,荧光信号最弱,随着温度升高,两条邻近单标记探针与靶标解离过程中,荧光信号有升高的趋势,对此进行熔解曲线分析,则可出现倒置的熔解峰,利用熔解峰方向的不同,将单管检测中 $T_m$ 值接近的同一荧光标记的靶标基因位点的熔解峰显著区分开来。

[0024] 综上所述,由于采用了上述技术方案,本发明的有益效果是:

[0025] (1) 本发明的多重PCR检测方法将传统的双标记自淬灭的TaqMan探针熔解曲线技术与两条邻近单标记探针联合淬灭的熔解曲线技术相结合,通过对引物及探针进行特殊设计,使多重反应体系中同一荧光标记 $T_m$ 值接近的靶序列的熔解峰形呈相反峰形(正峰和负峰),使不同靶标基因位点之间的熔解峰得到有效区分,显著降低了目前多重PCR熔解曲线技术引物探针的设计难度,解决了限制熔解曲线多重检测的技术难题,提高了检测效率,降

低了检测成本。

[0026] (2) 本发明提供的特异性引物探针序列组灵敏度高、特异性强、抗干扰能力强,有效区分背景信号,判读清晰简单,全程闭管检测实现多重靶标的精准鉴定。

[0027] (3) 本发明力在突破荧光PCR平台检测靶标有限的瓶颈,利用有限的荧光检测通道及较窄的温度范围内单管实现多达十几种靶标的检测,广泛适用于呼吸道病原体、HPV分型检测、耳聋基因检测等有多重检测需求的分子领域。

[0028] (4) 本发明提供的方法检测时间短、速度快,2个小时内即可完成96个样本的检测。

[0029] (5) 本发明相比PCR-Taqman MGB探针分型法具有不受限于仪器采集信号通道的优点,检测通量高,操作简便、快速、耗时短、成本低。

[0030] (6) 本发明相比ARMS-PCR法具有检测通量高、检测周期短及结果判读便捷、明确、客观等优点。大大提高检测效率,可进行大批量样本的检测,有利于临床操作。

[0031] (7) 本发明相比Luminex微珠法及MassARRAY核酸质谱技术减少了额外仪器开支,无疑成本更低,普及率较高。

[0032] (8) 本发明相比多重连接探针扩增技术 (MLPA) 法,具有无需PCR反应后开盖及利用毛细管电泳分辨扩增产物的繁琐操作过程,具有全程闭管操作,步骤简单,检测效率高的优点。

[0033] (9) 本发明相比双标记自淬灭TaqMan探针的熔解曲线分析技术,区分SNP等位基因的能力大大增强,灵敏度高、特异性强、检测通量高、抗干扰能力强,背景信号更低等优点。

[0034] 最终提供一种基于熔解曲线正负峰形分析的多重PCR检测方法及其应用,该方法具有免开盖、操作简便、快速、耗时短、高通量、灵敏度高、特异性强、准确度高、重复性好、成本低的熔解曲线多重检测技术。

## 附图说明

[0035] 图1为本发明的技术原理图。

[0036] 图2为样本1采用传统双标记自淬灭TaqMan探针熔解曲线技术在ROX单色通道检测AGTR1 (1166A>C) 位点杂合型AC及CYP2C9\*3 (1075A>C) 位点杂合型AC的熔解曲线检测结果图。

[0037] 图3为采用本发明方法单管检测高血压用药相关AGTR1 (1166A>C)、CYP2C9\*3 (1075A>C)、ADRB1 (1165G>C) 及ACE (I/D) 4个SNP位点的熔解曲线结果图。

[0038] 图4为采用本发明方法ROX单通道检测CYP2C9\*3 (1075A>C) 位点野生型AA及AGTR1 (1166A>C) 位点野生型AA的熔解曲线结果图。

[0039] 图5为采用本发明方法ROX单通道检测CYP2C9\*3 (1075A>C) 位点突变型CC及AGTR1 (1166A>C) 位点突变型CC的熔解曲线结果图。

[0040] 图6为样本1采用本发明方法ROX单通道检测AGTR1 (1166A>C) 位点杂合型AC及CYP2C9\*3 (1075A>C) 位点杂合型AC的熔解曲线结果图。

[0041] 图7为样本1采用本发明方法CY5单通道检测ADRB1 (1165G>C) 位点突变型CC及ACE (I/D) 位点杂合型ID的熔解曲线结果图。

[0042] 图8为样本1采用一代测序技术检测CYP2C9\*3 (1075A>C) 位点基因型AC的检测结果。

- [0043] 图9为样本1采用一代测序技术检测AGTR1 (1166A>C) 位点基因型AC的检测结果。
- [0044] 图10为样本1采用一代测序技术检测ADRB1 (1165G>C) 位点基因型CC的检测结果。
- [0045] 图11是为样本1采用一代测序技术检测ACE (I/D) 位点插入基因型II的检测结果。
- [0046] 图12是为样本1采用一代测序技术检测ACE (I/D) 位点缺失基因型DD的检测结果。

### 具体实施方式

[0047] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下结合附图及实施例,对本发明进行进一步详细说明,应当理解,此处所描述的具体实施例仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

#### [0048] 实施例1

[0049] 本实施例提供一种基于熔解曲线正负峰形分析的多重PCR检测方法,其原理如图1所示,包括如下步骤:

[0050] S1:根据靶标基因位点序列,分别设计具有相同单色荧光通道的特异性上游引物、下游引物和探针序列,靶标基因位点的数量至少为2种;每两个靶标基因位点中,靶标基因位点A的探针为双标记自淬灭TaqMan探针,长度介于18bp~30bp, $T_m$ 值介于45°C~75°C,且5'端标记荧光基团,3'端标记淬灭基团,靶标基因位点B的探针为两条邻近单标记联合淬灭探针P1、P2,探针P1的序列长度介于23bp~30bp, $T_m$ 值介于50°C~75°C,探针P1的3'端标记淬灭基团,探针P2的序列长度介于15bp~25bp, $T_m$ 值介于45°C~70°C,探针P2的5'端标记荧光基团,3'端磷酸化封闭处理,探针P1的长度大于探针P2,上述荧光基团选自FAM、VIC、ROX、CY5,淬灭基团选自BHQ1、BHQ2、BHQ3;

[0051] S2:配制多重PCR反应体系,多重PCR反应体系包括每种靶标基因的特异性探针、每种靶标基因的特异性上游引物和下游引物,其中靶标基因位点A的引物探针比例为上游引物:下游引物:探针=1:10:5,靶标基因位点B的引物探针比例为上游引物:下游引物:探针P1:探针P2=4:4:2:1;

[0052] S3:进行PCR扩增,该过程中,靶标基因位点A基于引物不对称扩增的方式获得单链杂交产物,靶标基因位点B则采用引物对称扩增的方式获得双链扩增产物,通过快速降温的方式获得单链杂交产物,降温速率介于0.1°C/s~4°C/s,在PCR扩增周期结束后,进行熔解曲线分析,熔解曲线程序为:95°C保持1min,43°C~75°C升温并以0.04°C/s~0.06°C/s的升温速度采集荧光信号,根据熔解峰形状及熔解峰 $T_m$ 值的差异判断多重单核苷酸的基因型。

#### [0053] 实施例2

[0054] 本实施例通过多重检测高血压精准用药相关基因多态性,对实施例1的基于熔解曲线正负峰形分析的多重PCR检测方法进行具体说明;应当注意的是,本实施例仅是对本发明方法的举例说明,不应视为对本发明方法应用方式的限制;在一些实施例中,本发明方法还适用于呼吸道病原体、HPV分型检测、耳聋基因检测、慢病个体化用药、肿瘤用药等具有多重PCR检测需求的领域。

[0055] 1、根据ACE (rs4646994)、ADRB1 (rs1801253)、AGTR1 (rs5186) 及CYP2C9\*3 (rs1057910) 4个SNP位点所在基因序列,应用MEGA4软件进行序列clustal W方法比对,在引物设计软件Primer Premier 5、探针设计软件Primer Express 3.0的辅助下,设计特异性检测引物及探针组,相关具体序列如下:

- [0056] AGTR1F1: TGAGTGACATGTTCGAAACC;  
 [0057] AGTR1R1: CAGCCGTCATCTGTCTAATGC;  
 [0058] CYP2C9\*3F1: ATCAGCTAAAGTCCAGGAA;  
 [0059] CYP2C9\*3R1: GAAACAAACTTACCTTGGAAT;  
 [0060] ADRB1F1: GCCTTCAACCCCATCATCT;  
 [0061] ADRB1R1: GTCGTCGTCGTCGTCGA;  
 [0062] ACEF1: TTTCTCTAGACCTGCTGCCTATAC;  
 [0063] ACER1: AGCTCAGAGAATTTTCAGAGCTG。

[0064] 2、将CYP2C9\*3 (rs1057910) 及AGTR1 (rs5186) 位点的荧光标记探针共同标记为ROX; ADRB1 (rs1801253) 及ACE (rs4646994) 位点的荧光标记探针共同标记为CY5。每组单色荧光标记探针均包含1条双标记自淬灭TaqMan探针和2条单标记邻近淬灭探针, 探针序列如下:

- [0065] AGTR1P1: ROX-AGCTAAGGCATTCAATTG-BHQ2, 5' 端标记ROX, 3' 端标记BHQ2;  
 [0066] CYP2C9\*3P1: CCCTACACAGATGCTGTGGTGCACGATCC-BHQ2, 3' 端标记BHQ2;  
 [0067] CYP2C9\*3P2: ROX-AGAGATACCTTCTTCTCCCCACCA-p, 5' 端标记ROX, 3' 端磷酸化;  
 [0068] ADRB1P1: CY5-AGGCCTTCCAGCGACAGCTCAGC-BHQ2, 5' 端标记CY5, 3' 端标记BHQ2;  
 [0069] ACEP1: CCCCAGACTTCCGCAAGGCCTTCC-BHQ3, 3' 端标记BHQ3;  
 [0070] ACEP2: CY5-CTGCTGCCTATACAGTCACTTTTATGTGG-p, 5' 端标记CY5, 3' 端磷酸化。

[0071] 应当说明的是, 在本实施例中, 使用的荧光基团包括ROX、CY5, 使用的淬灭基团包括BHQ2、BHQ3, 而在其它实施例中, 使用的荧光基团还可以是VIC、FAM, 使用的淬灭基团还可以是BHQ1。

[0072] 3、采集临床血液样本, 利用商品化的血液提取试剂盒提取基因组DNA, 所提DNA需用紫外分光光度计测定浓度和纯度, 其DNA OD260/OD280的值应在1.8~2.0, 浓度应在10~100ng/ $\mu$ l之间, 样本DNA质量不合格者不得用于检测, DNA质检合格后, 在-20 $^{\circ}$ C条件下保存提取的样本DNA作为备用。

[0073] 4、根据检测样本数计算所需反应数, 如样本数为n, 则需做n+2个反应(包含一个阳性对照反应和一个无模板对照反应), 计算所需反应液的体积, 并配制反应体系, 反应体系混匀后3000rpm快速离心30秒, 分装至PCR管中, 每管20 $\mu$ l, 具体PCR扩增反应体系如下表1所示:

[0074] 表1: PCR扩增反应体系

试剂	25 $\mu$ l中的试剂体积/ $\mu$ l
10 $\times$ buffer	2.5
dNTP	0.5
Ace酶	0.25
AGTR1F1	0.04
AGTR1R1	0.4
AGTR1P1	0.2
CYP2C9*3F1	0.4
CYP2C9*3R1	0.4



CYP2C9*3P1	0.2
CYP2C9*3P2	0.1
ADRB1F1	0.04
ADRB1R1	0.4
ADRB1P1	0.2
ACEF1	0.4
ACER1	0.4
ACEP1	0.2
ACEP2	0.1
PCR增效剂	8
水	5.27
模板	5

[0076] 5、取5 $\mu$ l提取的样品DNA加入PCR反应管，盖上管盖，1000rpm离心或轻甩，排除管底气泡，将均加有DNA的扩增检测试剂反应管置于实时荧光PCR仪中进行PCR扩增检测，反应程序设置如下2所示：

[0077] 表2：PCR反应程序

步骤	程序	温度 (°)	时间 (min:sec)	循环数
1	预变性	95	3:00	1
[0078] 2	扩增	95	00:10	50
		56	00:30	
		72	00:20	
3	熔解曲线	95	1:00	1
		43°~75°，以 0.04°/s 的升温速度采集荧光信号		

[0079] 6、根据靶基因熔解峰的形状及熔解峰的T<sub>m</sub>值范围，对样本DNA的基因型进行判读，判读方法如下表3所示：

[0080] 表3：靶基因熔解T<sub>m</sub>值范围与基因型对照表

反应管	荧光通道以 及对应基因	结果判读		熔解峰形
		Tm 野生型	Tm 突变型	
[0081]  1	ROX 通道 AGTR1(1166A>C)	48.5-50 AA	55.5-57 CC	正峰
	ROX 通道 CYP2C9(1075A>C)	61.5-63 AA	68.5-70 CC	
	CY5 通道 ADRB1(1165G>C)	48-49.5 GG	55-56.5 CC	正峰
	CY5 通道 ACE(I/D)	61.5-63 II	71-72.5 DD	

[0082] 选取一个样本1,分别使用本发明方法及传统双标记自淬灭TaqMan探针熔解曲线技术对样本1的高血压精准用药相关CYP2C9\*3 (1075A>C) 位点进行检测,结果如附图2、图6所示。

[0083] 图2为传统双标记自淬灭TaqMan探针熔解曲线技术在ROX单色荧光通道检测AGTR1 (1166A>C) 位点杂合型AC及CYP2C9\*3 (1075A>C) 位点杂合型AC的熔解曲线检测结果。

[0084] 图3为采用本发明方法单管检测高血压用药相关AGTR1 (1166A>C)、CYP2C9\*3 (1075A>C)、ADRB1 (1165G>C) 及ACE (I/D) 4个SNP位点的多重熔解曲线结果图,检测效率成倍提高,检测成本大幅降低,便于临床大规模推广。

[0085] 图4~图6为本发明方法ROX单通道检测CYP2C9\*3 (1075A>C) 位点野生型AA及AGTR1 (1166A>C) 位点野生型AA、CYP2C9\*3 (1075A>C) 位点突变型CC及AGTR1 (1166A>C) 位点突变型CC、AGTR1 (1166A>C) 位点杂合型AC及CYP2C9\*3 (1075A>C) 位点杂合型AC的熔解曲线检测结果。

[0086] 图7为本发明方法CY5单通道检测ADRB1 (1165G>C) 位点突变型CC及ACE (I/D) 位点杂合型ID的熔解曲线检测结果。

[0087] 对比图2和图6可知,本发明方法的ROX单通道检测AGTR1 (1166A>C) 位点杂合型AC及CYP2C9\*3 (1075A>C) 位点杂合型AC熔解曲线中,AGTR1 (1166A>C) 位点杂合型AC的熔解峰为正峰,而CYP2C9\*3 (1075A>C) 位点杂合型AC的熔解峰为负峰,从而将二者相邻的峰进行明显区分,但传统双标记自淬灭TaqMan探针熔解曲线技术在ROX单色通道检测AGTR1 (1166A>C) 位点杂合型AC及CYP2C9\*3 (1075A>C) 位点杂合型AC时,熔解峰均为正峰,极易导致相邻的两个熔解峰出现融合而难以准确对多重靶位点基因型别进行精准区分,从而影响对最终检测结果的判读。而本发明方法很好的规避了这一问题,使检测结果判读便捷、明确。

[0088] 实施例3

[0089] 本实施例选取了24例高血压患者的临床样本,分别采取一代测序以及实施例2中的方法进行PCR检测,通过对比一代测序和实施例2方法的检测结果,对本发明方法的结果准确性进行比对验证。

[0090] 1、采集某中心医院高血压患者的血液样本,使用市售某血液DNA试剂盒进行核酸提取,获得DNA样本,并对纯度及浓度进行检测,使其符合,提取过程中对各个样本进行标记,以避免样本混淆。

[0091] 2、在洁净工作台中,按照下表4~7配制PCR反应混合液,震荡、瞬时离心后按照样本数量分装到相应数量的PCR8联管中,每孔23 $\mu$ L,并做好标记:

[0092] 表4 ADRB1 (1165G>C) 反应体系

序号	名称	工作浓度	终浓度	1人份
1	CXADRB1F1	25 $\mu$ M	0.2 $\mu$ M	0.2 $\mu$ L
2	CXADRB1R1	25 $\mu$ M	0.2 $\mu$ M	0.2 $\mu$ L
3	2*Rapid Taq Master Mix	1mL	-	12.5 $\mu$ L
4	ddH <sub>2</sub> O	-	-	6.1 $\mu$ L
5	PCR增效剂			4 $\mu$ L
6	模板	-	-	2 $\mu$ L

[0094] 表5 CYP2C9\*3反应体系

序号	名称	工作浓度	终浓度	1人份
1	CXCYP2C9*3F1	25 $\mu$ M	0.2 $\mu$ M	0.2 $\mu$ L
2	CXCYP2C9*3R1	25 $\mu$ M	0.2 $\mu$ M	0.2 $\mu$ L
3	2*Rapid Taq Master Mix	1mL	-	12.5 $\mu$ L
4	ddH <sub>2</sub> O	-	-	10.1 $\mu$ L
5	模板	-	-	2 $\mu$ L

[0096] 表6 AGTR1 (1166A>C) 反应体系

序号	名称	工作浓度	终浓度	1人份
1	CXAGTR1F1	25 $\mu$ M	0.2 $\mu$ M	0.2 $\mu$ L
2	CXAGTR1R1	25 $\mu$ M	0.2 $\mu$ M	0.2 $\mu$ L
3	2*Rapid Taq Master Mix	1mL	-	12.5 $\mu$ L
4	ddH <sub>2</sub> O	-	-	10.1 $\mu$ L
5	模板	-	-	2 $\mu$ L

[0098] 表7 ACE (I/D) 反应体系

序号	名称	工作浓度	终浓度	1人份
1	CXACEF1	25 $\mu$ M	0.2 $\mu$ M	0.2 $\mu$ L
2	CXACER1	25 $\mu$ M	0.2 $\mu$ M	0.2 $\mu$ L
3	2*Rapid Taq Master Mix	1mL	-	12.5 $\mu$ L
4	ddH <sub>2</sub> O	-	-	10.1 $\mu$ L
5	模板	-	-	2 $\mu$ L

[0100] 3、反应混合液配制完成后,通过传递窗移至样本制备室,在生物安全柜中,将提取的DNA样本加入到八联管中,每孔2 $\mu$ L,盖紧管盖后,瞬时离心,操作过程中应避免产生气泡,确保管壁无液体附着,然后转移至PCR扩增区,按照下表8的PCR扩增程序进行扩增反应,扩增完成后,将反应液做好标记,委托第三方生物公司进行测序。

[0101] 表8 PCR扩增程序

程序	循环数	温度	反应时间
1	1	95°C	5min
[0102] 2	40	95°C	30sec
		68°C (每个循环减 0.3°C)	30sec
		72°C	20sec
3	1	72°C	5min

[0103] 4、采用实施例1的方法,对24个高血压患者的临床样本进行高血压用药相关4个SNP位点进行PCR熔解曲线检测,统计检测结果。

[0104] 5、将上述3中的测序结果与4中PCR熔解曲线检测的结果进行对比,如下表9所示:

[0105] 表9:临床样本熔解曲线检测结果与一代测序比对结果

样本 编号	采用本发明进行熔解曲线检测结果				一代测序检测结果			
	ADRB111 65	CYP2C9*3	AGTR111 66	ACE	ADRB111 65	CYP2C9*3	AGTR111 66	ACE
1	CC	AC	AA	ID	CC	AC	AA	ID
2	CC	AA	AA	ID	CC	AA	AA	ID
3	GC	AA	AA	ID	GC	AA	AA	ID
4	GC	AA	AA	DD	GC	AA	AA	DD
[0106] 5	CC	AA	AA	ID	CC	AA	AA	ID
6	CC	AA	AA	II	CC	AA	AA	II
7	GC	AA	AA	II	GC	AA	AA	II
8	CC	AA	AA	ID	CC	AA	AA	ID
9	GG	AA	AA	II	GG	AA	AA	II
10	GG	AA	AA	DD	GG	AA	AA	DD
11	GC	AA	AC	ID	GC	AA	AC	ID
12	CC	AA	AA	DD	CC	AA	AA	DD

[0107]

13	CC	AA	AA	ID	CC	AA	AA	ID
14	CC	AA	AA	II	CC	AA	AA	II
15	CC	AA	AA	ID	CC	AA	AA	ID
16	CC	AA	AA	ID	CC	AA	AA	ID
17	GC	AA	AA	II	GC	AA	AA	II
18	CC	AA	AA	II	CC	AA	AA	II
19	CC	AA	AA	DD	CC	AA	AA	DD
20	CC	AA	AA	II	CC	AA	AA	II
21	CC	AA	AA	ID	CC	AA	AA	ID
22	CC	AA	AA	ID	CC	AA	AA	ID
23	CC	AA	AA	II	CC	AA	AA	II
24	CC	AC	AC	ID	CC	AC	AC	ID

[0108] 如表9所示,经过对比,本发明的基于熔解曲线正负峰形分析的多重PCR检测方法,其检测结果与一代测序的结果相比,各SNP位点基因型符合率均在100%,说明本发明的方法检测准确性高,可操作性强。图8~图12为临床样本1的一代测序结果图,对比实施案例2中图4~图7可以看到,本发明方法对样本1的高血压精准用药相关基因多态性熔解曲线检测结果与一代测序结果完全符合,准确率满足临床应用的要求。此外,本发明方法是对24个样本同时进本发明方案的熔解曲线检测,总耗时不到2小时,检测时长比测序法大幅缩短,且最多可同时对96个样本进行同时检测,检测效率成本提高。

[0109] 本发明针对目前熔解曲线技术对单管检测多重靶标技术实现的困难性,旨在突破荧光PCR平台检测靶标有限的瓶颈,利用现有荧光PCR平台有限的荧光检测通道及较窄的温度范围内单管实现多达十几种靶标的检测,解决限制熔解曲线多重检测的技术难题,提高检测效率,降低检测成本。

[0110] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内所做的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

## 序列表

<110> 郑州华之源医学检验实验室有限公司

<120> 一种基于熔解曲线镜像峰形分析的多重PCR检测方法及应用

<160> 14

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> rs1057910F1

<400> 1

atcagctaaa gtccaggaa 19

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> rs1057910R1

<400> 2

gaaacaaact taccttgga at 22

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> rs5186F1

<400> 3

tgagtgacat gttcgaacc 20

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> rs5186R1

<400> 4

cagccgtcat ctgtctaatg c 21

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> rs4646994F1

<400> 5

tttctctaga cctgctgcct atac 24

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> rs4646994R1  
<400> 6  
agctcagaga atttcagagc tg 22  
<210> 7  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> rs1801253F1  
<400> 7  
gccttcaacc ccatcatct 19  
<210> 8  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> rs1801253R1  
<400> 8  
gtcgtcgtcg tcgtccga 18  
<210> 9  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> rs5186P1  
<400> 9  
agctaaggca ttcaattg 18  
<210> 10  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> rs1057910P1  
<400> 10  
ccctacacag atgctgtggt gcacgatcc 29  
<210> 11  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> rs1057910P2  
<400> 11  
agagatacct tccttctccc cacca 25  
<210> 12  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> rs4646994P1  
<400> 12  
ccccgacttc cgcaaggcct tcc 23

<210> 13

<211> 29

<212> DNA

<213> rs4646994P2

<400> 13

ctgctgccta tacagtcact tttatgtgg 29

<210> 14

<211> 23

<212> DNA

<213> rs1801253P1

<400> 14

aggccttcca gcgacagetc agc 23



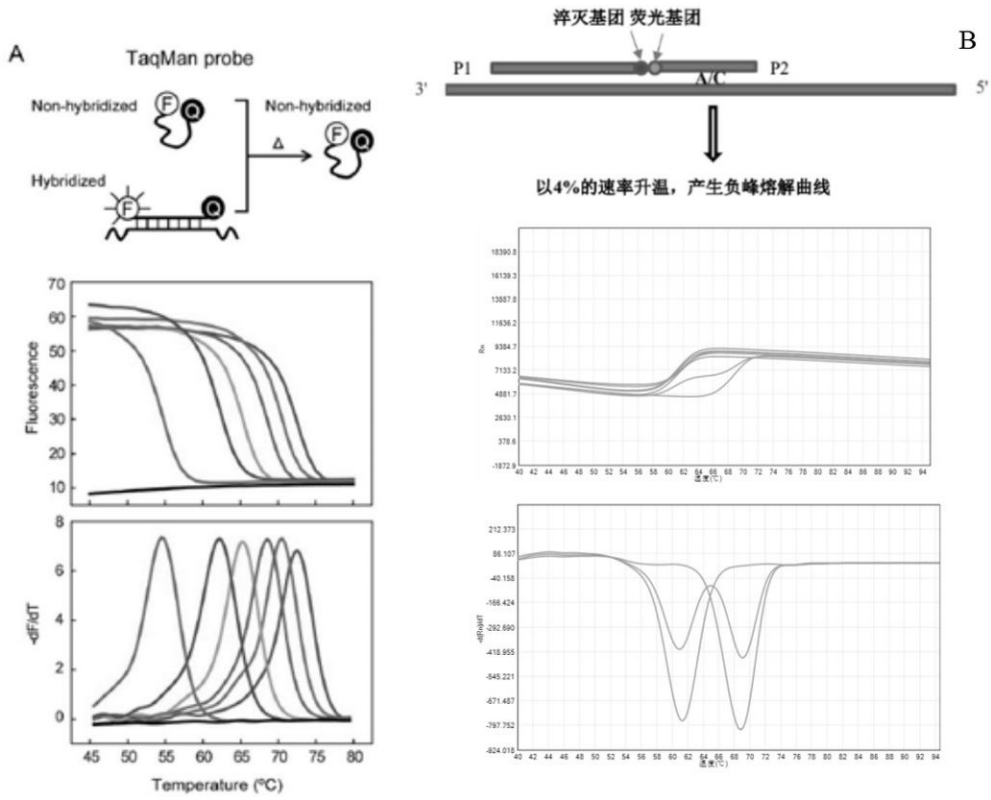


图1

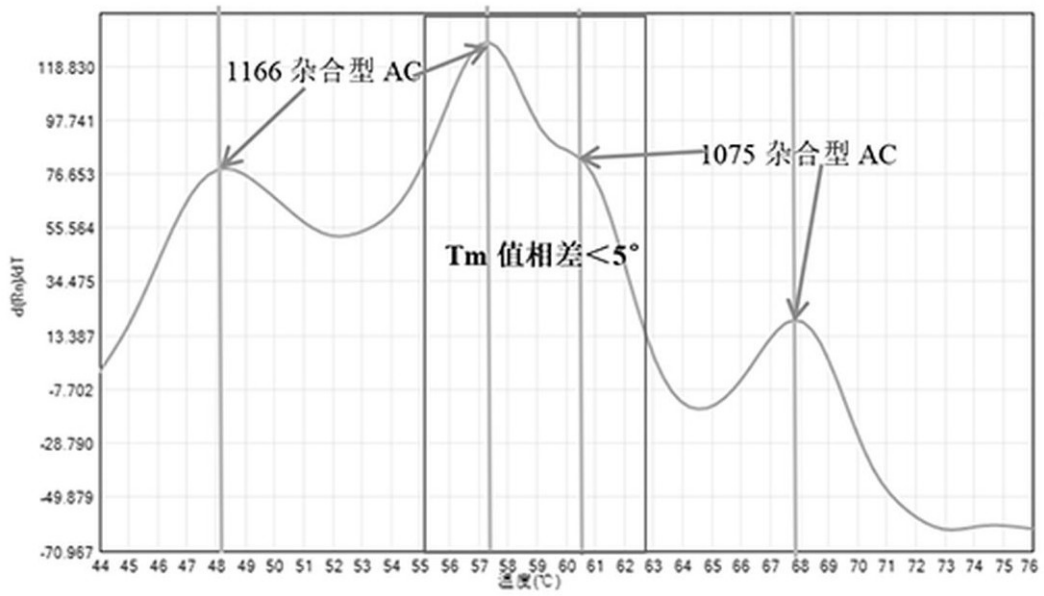


图2

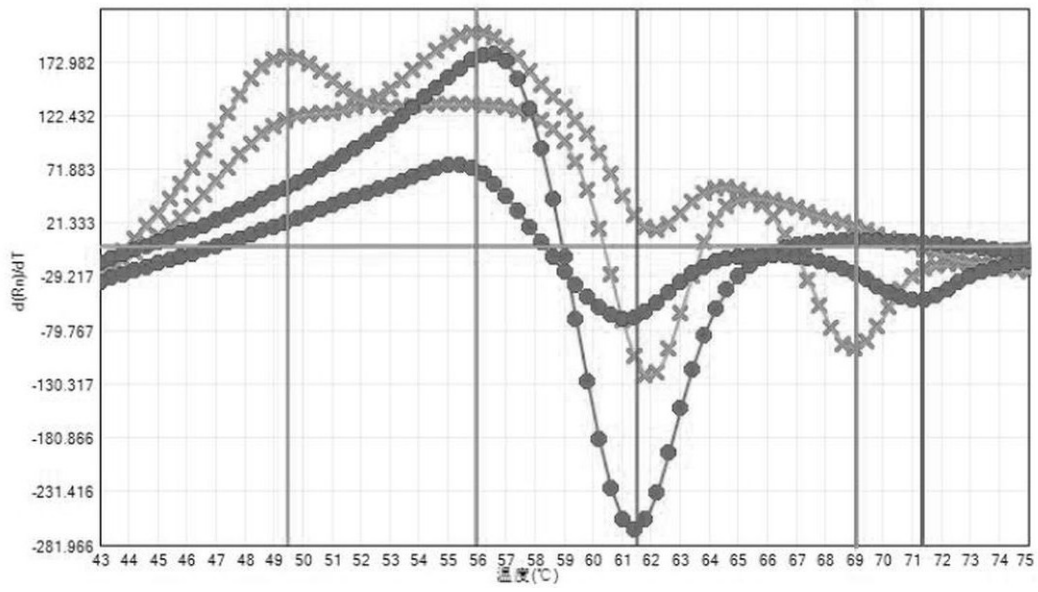


图3

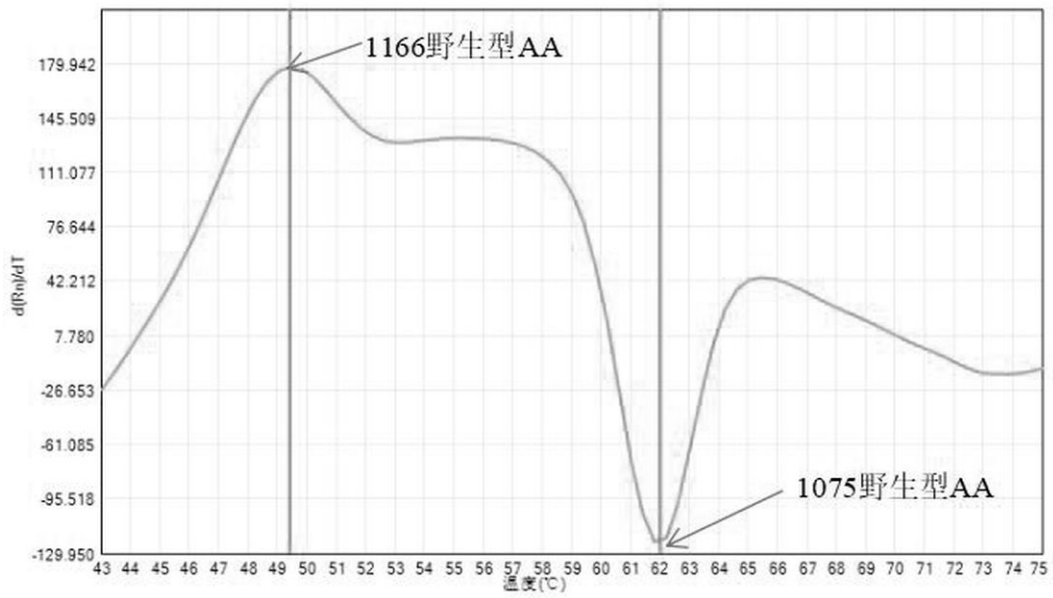


图4

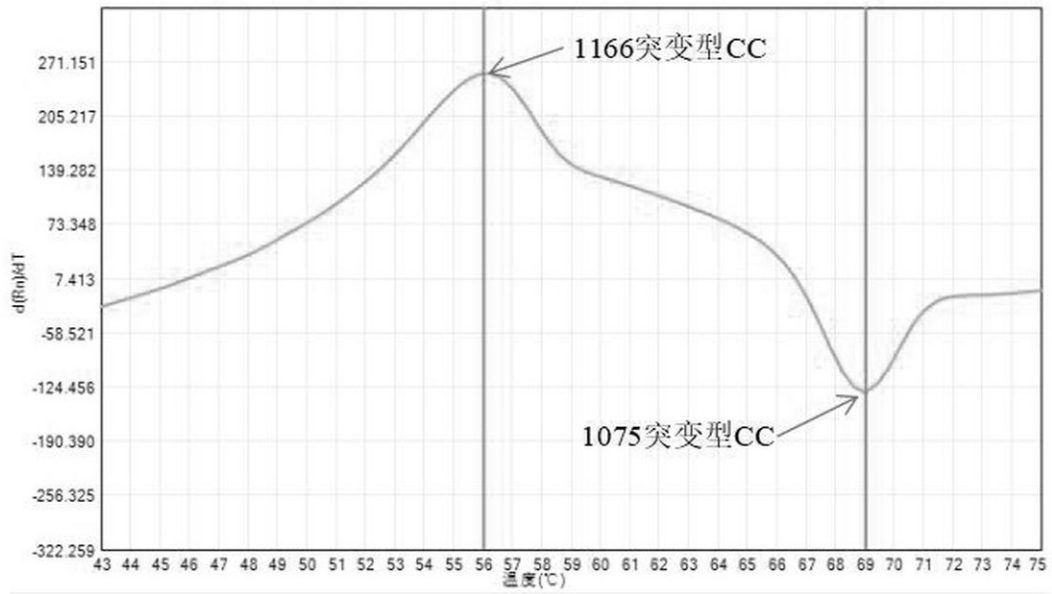


图5

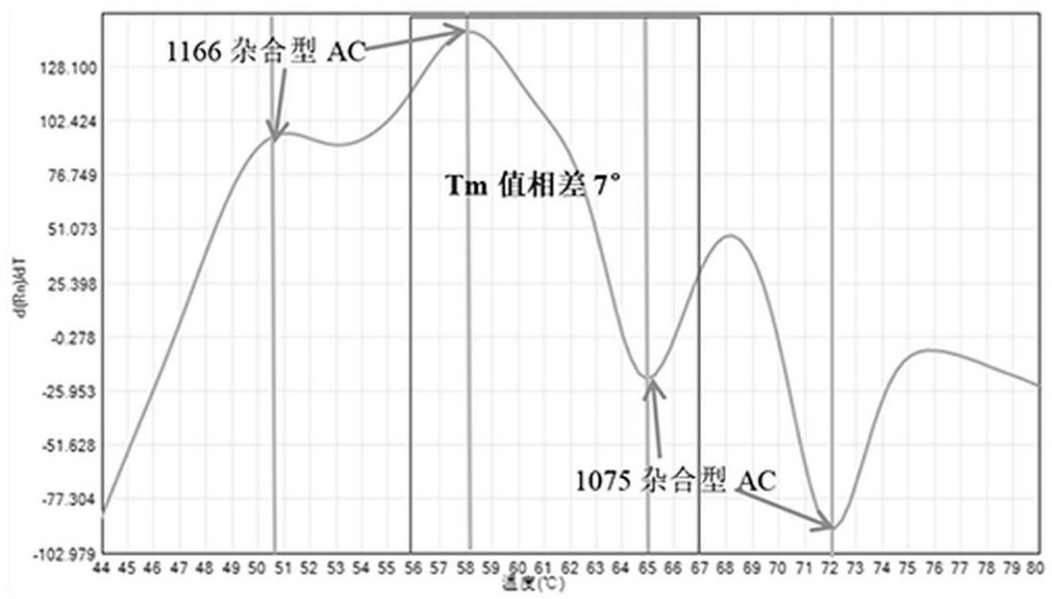


图6

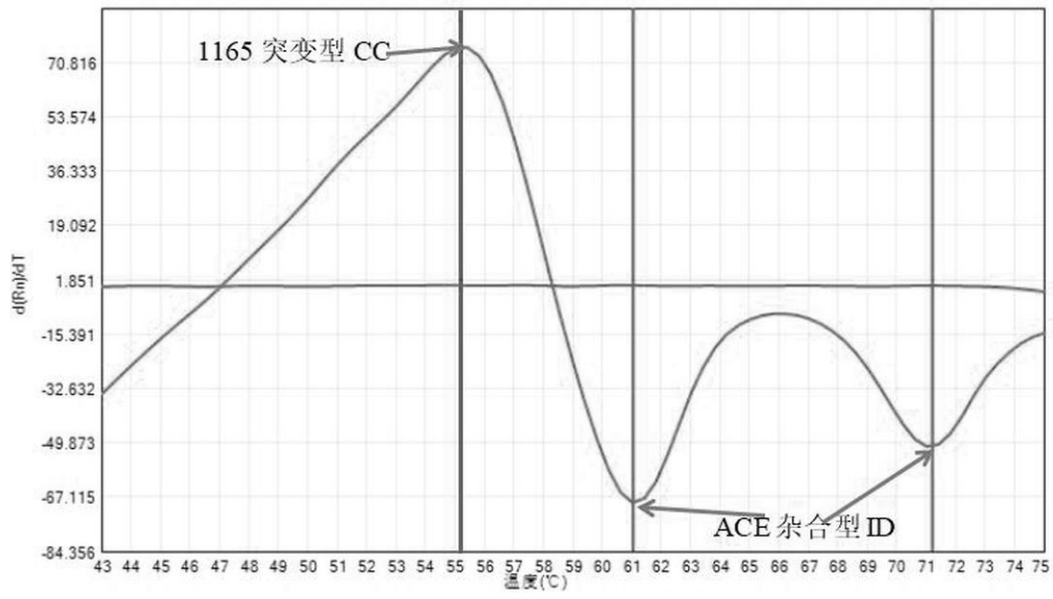


图7

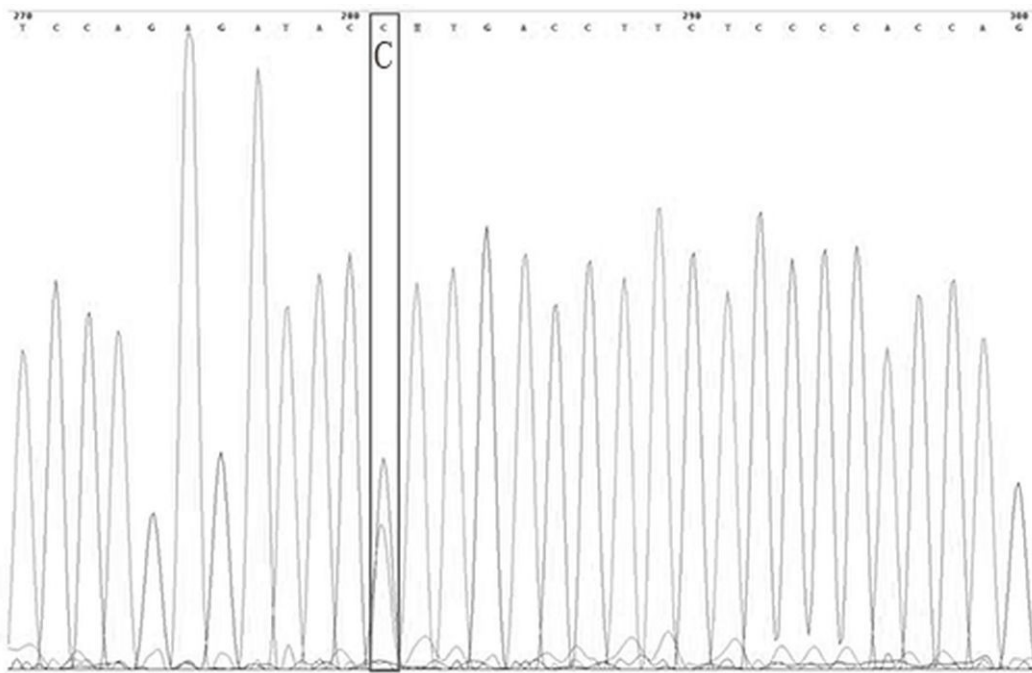


图8

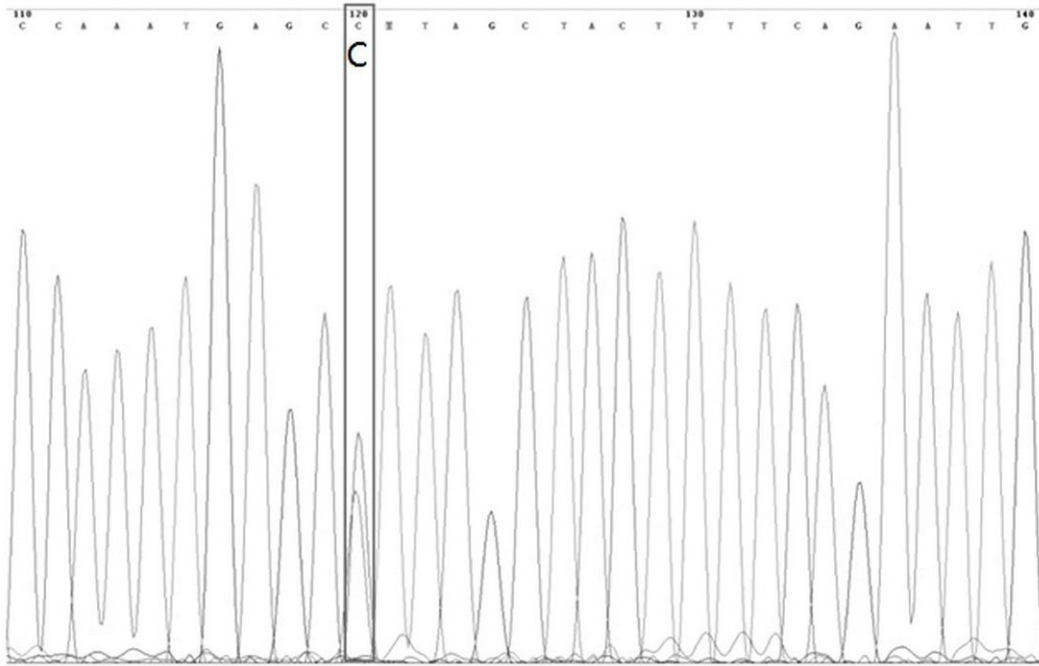


图9

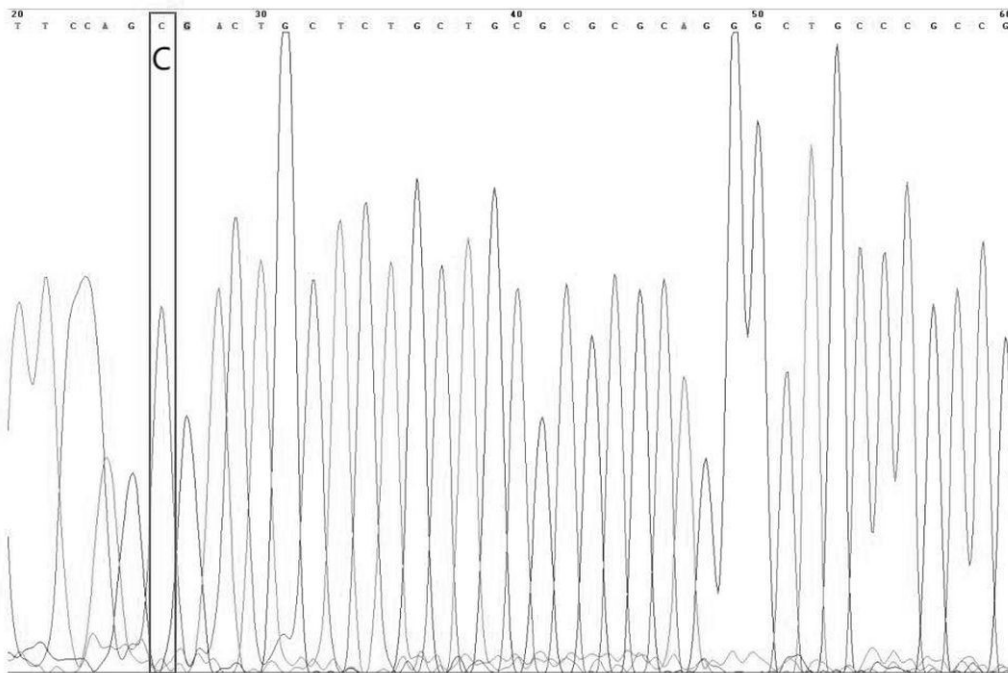


图10

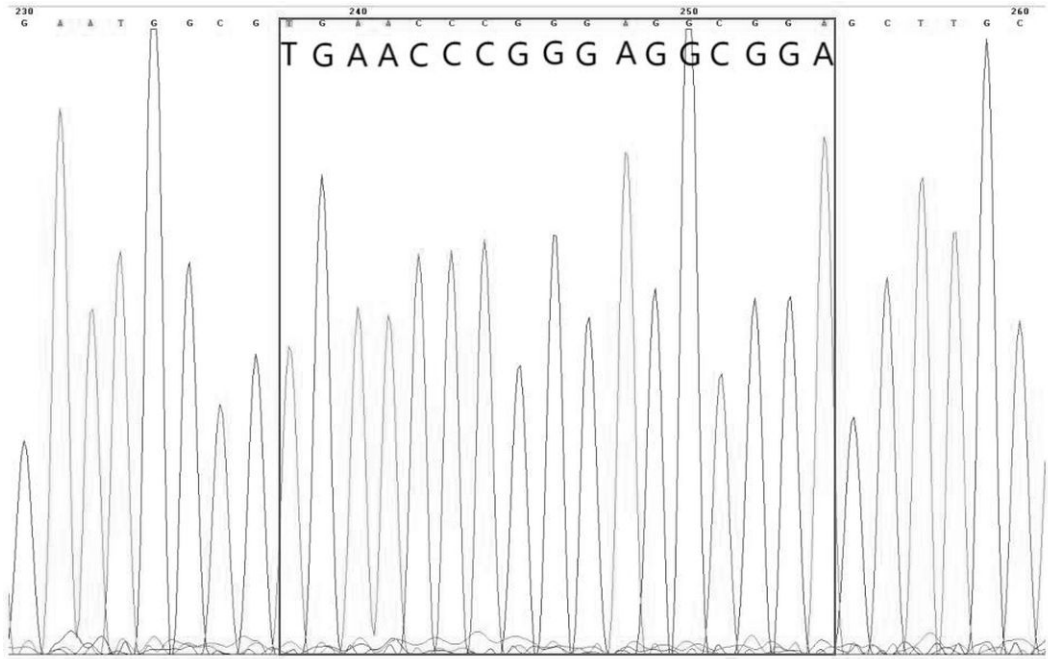


图11

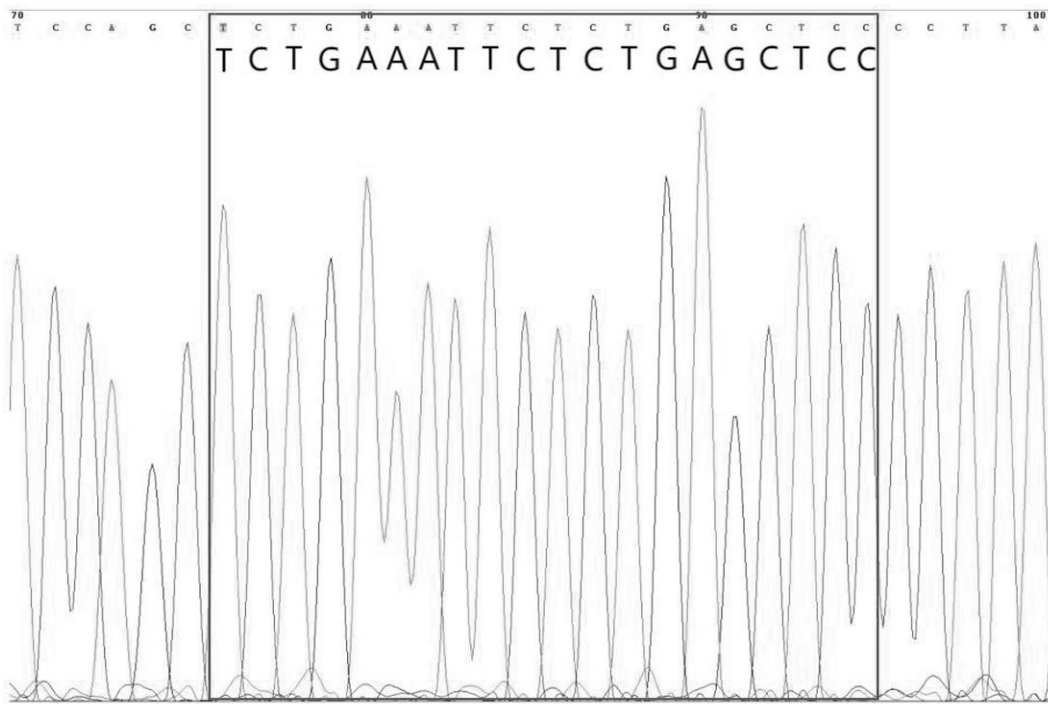


图12